M145F/F146M突变对光受体蛋白细菌视紫红质和古紫质4光循环的影响*

杨雅楠　孙　超　崔浩琳　赵　欣**
（华东师范大学物理与材料科学学院　上海磁共振重点实验室　上海 200062）

摘要 古紫质4（archaerhodopsin 4, aR4）与细菌视紫质（bacteriorhodopsin, bR）同属于盐杆菌科，同源性59%，均为光驱质子泵。其功能是在光照条件下将质子由胞内泵到胞外形成跨膜质子梯度，该梯度差被膜上另外一种蛋白ATP合成酶用于ATP的合成，从而完成光能向生物能的转化。aR4和bR具有相似的光循环过程，但质子传递时序不同，aR4是先从胞内吸收质子再将质子释放到胞外，而bR恰好相反。甲硫氨酸-145是位于bR视黄醛发色团键合区的一个重要残基，对其光循环有着重要的影响，而在aR4中处在相应位置上的苯丙氨酸-146是其视黄醛键合区与bR唯一不相同的残基。因此通过定点突变，采用紫外可见吸收光谱、动力学光谱、质子泵功能检测、低温透射红外光谱等手段对比分析研究M145F和F146M单点突变对bR和aR4光循环造成的影响，有助于深入理解aR4结构与功能的关系。研究结果表明，M145F突变造成了bR光循环L的丢失和质子泵功能的减弱，而F146M突变并未对aR4的光循环造成显著影响，且突变后aR4质子释放时序没有反转，表明该位置上的残基在两个体系中的作用不尽相同。

关键词 古紫质4　M145F/F146M　单点突变　光循环中间态　质子泵　低温投射红外光谱

中图分类号　Q93

*国家自然科学基金资助项目（21475045，30970657）

**通讯作者，电子信箱：xzhao@phy.ecnu.edu.cn

细菌视紫质（bacteriorhodopsin, bR）是从盐杆菌科盐杆菌属（*Halobacterium salinarum*）发现的一种视黄醛蛋白，也是发现最早，研究最为透彻的一类光驱质子泵蛋白。在经过光激发后，产生一系列的中间态产物，并完成从基态到 K、L、M、N、O 态的转变最终回到基态的光循环过程[1]。光激发的结果是快速释放一个质子到胞外侧，之后从胞内侧再吸收质子[2]。bR 与 G-蛋白偶联受体（G-protein coupled receptors, GPCRs）有着相似的七-跨膜结构以及功能形式，并且其结构和功能都研究得较为透彻，因此常被作为研究 GPCRs 的天然模型[3]。

古紫质 4 是从我国西藏盐湖发现的 *Halobacterium species*. xz515 菌株中提取出来的一类类 bR 蛋白，与 bR 同源性为 59%[4]。aR4 受光激发后进入与 bR 类似的光循环，产生一系列的中间态。不同的是在光循环过程中，其质子吸收释放的过程与 bR 恰好相反。目前 aR4 结构尚未获得解析，因其与 bR 同样具有三聚体结构[5]，将其与 bR 进行对比研究有助于深入认识其结构与功能的关系。

由于酰胺带的强度和形状对蛋白二级结构和氢键网络十分敏感，傅里叶变换红外光谱（Fourier transform infrared spectroscopy, FTIR）技术得以广泛地用于研究 bR 的结构、光循环中间态和构象动态变化。Braiman 等人通过构建 D85E，D96E 突变体，对比突变体和野生型中间态的红外差谱，首次证实 1761 cm^{-1}（+）的 C=O 伸缩振动出现标志着 D85 在 M 态的质子化，从而确定了 D85 为席夫碱的质子受体，同时确定了 1742/1748 cm^{-1}（-/+）为质子化的 D96 的峰[6]。D96E、D96A 突变体的红外光谱研究发现 D96 突变后其 N 态 1742 cm^{-1} 处的峰发生位移，且在碱性条件下增强，从而证实了 D96 在 N 态时为去质子化状态，即 D96 为席夫碱的质子供体[7]。Y57D 突变体的红外光谱和拉曼光谱研究推测，Y57D 不存在席夫碱的去质子化，质子传递是通过和 D212 的相互作用得以实现[8]。

甲硫氨酸-145（methionine-145，M145）是位于 bR 视黄醛发色团键合区的一个重要残基，对其光循环有着重要的影响。M145F 突变与野生型 bR 相比，暗适应态下视黄醛顺反比例发生变化[9]，并且影响 L 态的生成[10]。可能的原因是 M145 突变影响了 W182 和视黄醛侧链甲基之间的相互作用，从而影响了视黄醛从全反式到 13 顺式的转换[3]。苯丙氨酸-146（phenylalanine-146, F146）是 aR4 中处于视黄醛发色团键合区与 M145 相应位置的残基，也是视黄醛发色团键合区

唯一与 bR 不相同的残基。F146 对 aR4 光循环的影响以及是否与 aR4 的质子传递时序相关目前尚未见报道。因此，本文通过构建 M45F 和 F146M 突变体，采用傅里叶变换红外光谱技术，并辅以其它多种吸收光谱研究技术，对 M145F 和 F146M 的作用进行对比分析，以期对 F146 在 aR4 质子传输过程中的角色进行一些初步探究。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株与质粒

实验所用 bR 表达缺陷型菌株 *Halobacterium species* L33 和 aR4 嗜盐菌 *Halobacterium species* xz515 均由复旦大学丁建东教授惠赠。

1.1.2 酶和试剂

T4 DNA 连接酶、Taq DNA 聚合酶、Pfu DNA 聚合酶、DNA 酶 I、RNA 酶、限制性内切酶 BamH Ⅰ 和 HindⅢ、DNA Marker、Protein Marker，以上试剂均购于 Takara 公司；四环素购于上海生物工程技术服务公司；PEG-600 和新生霉素购于 Sigma 公司；质粒提取试剂盒和胶回收试剂盒购于 AxyGen 公司。

1.1.3 培养基

1) 蛋白胨液体培养基（PM）1 L：NaCl 250 g，$MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 20 g，柠檬酸钠 3 g，KCl 2 g，$CaCl_2$ 0.2 g，Oxoid L37 10 g，pH 7.4
2) 再生液体培养基 1L：PM 培养基中加入 15%蔗糖和 50 mM Tris-HCl，pH 7.2
3) 再生半固体培养基则是在再生液体培养基中加入 0.6%琼脂
4) 再生固体培养基是在再生液体培养基中加入 1.2%的琼脂
5) 原生质形成液：15%蔗糖，2M NaCl，27 mM KCl，50 mM Tris-HCl，pH 8.8

1.1.4 缓冲液

2mM 磷酸盐缓冲液（Phosphate Buffered Saline, PBS）1 L：NaCl 1.6g，KCl 0.04g，Na_2HPO_4 0.288g，KH_2PO_4 0.048g，0.025%NaN_3，pH7

1.2 方法

1.2.1 PCR 引物设计

采用 PCR 进行 *bop* 和 *ar4* 基因的定点突变，PCR 反应使用的引物如下:

表 1 引物序列

Table 1 Primers used for amplification

gene	Primer name	Primer sequence（5’-3’）
bop	P1	5’-CGGGATCCGACGTGAAGATGGGG-3’
bop	P2	5’-GCCAAGCTTCTAGATCAGTCGCTG -3’
M145F^{L33}*-bop*	P3	5’- CACCGCAGCGTTCCTGTACATC -3’
	P4	5’-GATGTACAGGAACGCTGCGGTG-3’
F146M^{L33}*-aR4*	P5	5’-CGATGCTGTTCGTGCTGTACTACCTC-3’
	P6	5’-GAGGTAGTACAGCACGAACAGCATCG-3’

突变体的构建参考文献[11]所述方法进行。重组表达载体命名为pNor-*M145F-bop* 和 pNor-*F146M-ar4*。

1.2.3 嗜盐菌同源转化和筛选

嗜盐菌的转化方法参考文献中所示方法进行[12]。

1.2.4 蛋白的表达与纯化

蛋白用 PM 液体培养基培养，纯化采用文献[13]提供的方法，将获得的蛋白分别命名为 RC^{L33}-aR4、F146M^{L33}-aR4、RC^{L33}-bR、M145F^{L33}-bR（RC, Recombinant）。蛋白纯化后采用 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳（SDS-Polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE）测定分子量大小，用 Bradford 法测定蛋白质浓度。

1.2.5 紫外-可见光扫谱

取适量的蛋白样品悬浮在 pH 7 的 100 mM NaCl，20 mM KCl 的缓冲溶液中，使用紫外-可见光分光光度仪（T6 新世纪）对纯化后蛋白进行紫外-可见光吸收光谱的测定。

1.2.6 闪光动力学光谱

用 pH 7 的 100 mM NaCl，20 mM KCl 缓冲溶液配置一定浓度的蛋白溶液，在室温下，采用自制的动力学光谱仪也称为闪光光谱仪测量样品的光循环中间态。用照相机闪光灯作为激发光源，测量光由卤钨灯提供，垂直于激发光。M 态在 412nm 处进行测量，O 态在 660nm 处进行测量，所有样品均进行了光适应态转化。通过多次采集及平均化处理以提高谱图的信噪比。

1.2.7 质子泵功能检测

质子泵功能检测选用对介质 pH 瞬间微小变化较为敏感的染料 pyranine 作为指示剂，通过比较添加染料前后蛋白悬液在 456 nm 处由于 pH 变化引起的吸光度改变，从而判断蛋白光循环过程中质子的释放和摄取顺序。

1.2.8 低温透射红外光谱

用 2mM pH7 的 PBS 缓冲液配制 0.5mM 蛋白溶液，取 100uL 样品滴加到 CaF2 窗片上干燥形成直径 10mm 的斑点。用蒸馏水重新水合后，将窗片安置到 Specac K22786 型号的低温透射池上进行控温，K、L、M、N 四个中间态的温度分别控制在 90K、170K、210K、250K。使用 Nicolet 8700 红外谱仪，以分辨率 $4 cm^{-1}$，1024 次扫描采集 $4000\text{-}1000 cm^{-1}$ 范围内的谱图，获得的谱图采用 OMNIC 8.0 软件进行处理。

2 结果讨论

2.1 aR4 和 bR 氨基酸序列比对

aR4 和 bR 氨基酸序列比对分析结果如图 1 所示，两者序列的同源性为 59%，其中红色和蓝色标记的残基分别为视黄醛结合口袋中相同和不相同的残基。

```
                             20                                49   53  57
bR   1    QAQITGRPEWIWLALGTALMGLGTLYFLVKGMGVSDPDAKKFYAITTLVPAIAFTMYLSM   60
aR4  1    DLLGDGRPETLWLGIGTLLMIIGTFYFIAQGWGVTDKEAREYYAITILVPGIASAAYLAM   60
          :    **** :**.:**:** :**:**:.:* **:* :*:::**** ***.** : **:*

                                   85/86 89/90 93                115 118
bR   61   LLGYGLTMVPFG-GEQNPIYWARYADWLFTTPLLLLDLALLVDADQGTILALVGADGIMI   118
aR4  61   FFGIGVTEVELASGAVLDIYYARYADWLFTTPLLLLDLALLAKVDRVSIGTLIGVDALMI   119
          ::* *:* * :. *    **:*********************...*: :* :*:*.*.:**

            122                  138 141  145
bR   119  GTGLVGALTKVYSYRFVWWAISTAAMLYILYVLFFGFTSKAESMRPEVASTFKVLRNVTV   178
aR4  120  VTGLIGALSKTPLARYTWWLFSTIAFLFVLYYLLTSLRSAAAQRSEEVQSTFNTLTALVA   179
           ***:***:*.   *:.** :** *:*::** *: .: * * .   ** ***:.*  :..

           182/185/186/189                     212  216
bR   179  VLWSAYPVVWLIGSEGAGIVPLNIETLLFMVLDVSAKVGFGLILLRSRAIFGEAEAPEPS   238
aR4  180  VLWTAYPILWIVGTEGAGVVGLGVETLAFMVLDVTAKVGFGFALLRSRAILGETEAPEPS   239
          ***:***::*::*:****:* * :*** ******:******: *******:**:******

bR   239  AGDGAAATSD    248        P02945     BACR_HALSA
aR4  240  AGT-------    243        Q9HH34     Q9HH34_HALSI
          **
```

图 1 bR 和 aR4 基因氨基酸序列比对

Figure 1 Amino acid sequence alignments of bR and aR4

2.2 SDS-PAGE 分子量测定

纯化后的蛋白经 SDS-PAGE 检测的结果如图 2 所示，M145F^{L33}-bR，F146M^{L33}-aR4 的大小与 RC^{L33}-bR，RC^{L33}-aR4 一致，均为 26kDa，说明 M145F^{L33}-bR，F146M^{L33}-aR4 在 L33 体系中成功表达。



图 2 重组 bR 和 aR4 蛋白的 SAS-PAGE 检测

Figure 2 SDS-PAGE of the recombinant of bR and aR4

2.3 紫外-可见吸收光谱测定

重组 bR 和 aR4 蛋白的紫外-可见吸收光谱测定结果如图 3 所示。M145F^{L33}-bR 突变体（560nm）与其对应的重组野生型蛋白 RC^{L33}-bR（564nm）相比发生了 4 nm 的蓝移，而 F146M^{L33}-aR4（547nm）相对于 RC^{L33}-aR4（544nm）发生了 3 nm 红移。M145F^{L33}-bR 发生蓝移说明视黄醛发色团激发态键级改变高于基态键级改变，与野生型相比扭曲相对增大。而 F146M^{L33}-aR4 则相反，与野生型相比视黄醛发色团的扭曲相对减小。RC^{L33}-aR4 和 F146M^{L33}-aR4 在 412nm 处均显现出了一个类 M 态的吸收峰，表明 aR4 可能存在着一定的基底活性，而这一基底活性的存在可能是导致其质子泵功能减弱的原因之一，值得进一步深入研究。

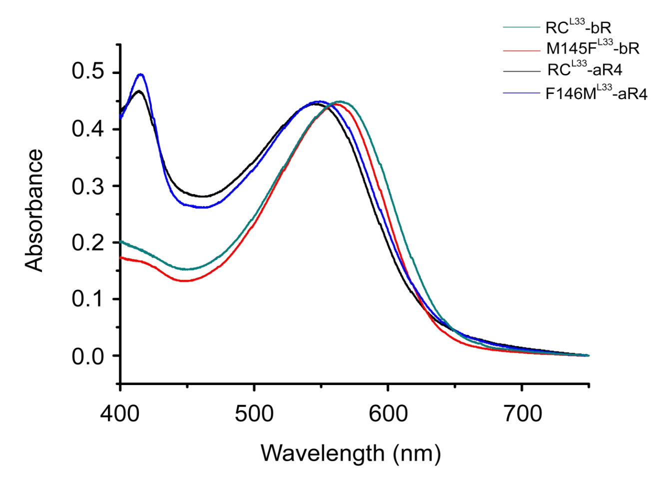


图 3 重组 bR 和 aR4 蛋白的紫外-可见吸收光谱

Figure 3 UV-VIS absorption spectra of the recombinant of bR and aR4

2.4 动力学光谱检测

所有的样品均重悬于 pH 7 的 100 mM NaCl，20 mM KCl 缓冲溶液中，在室温下测定蛋白的光循环中间态，如图 4 所示。

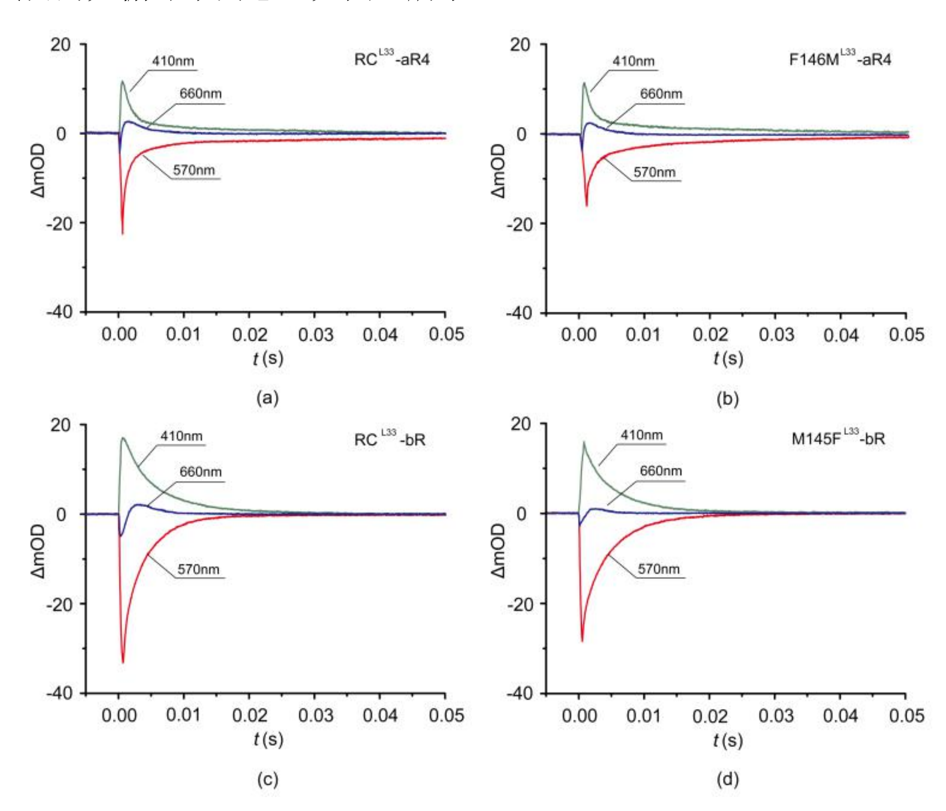


图 4 重组 bR 和 aR4 蛋白的闪光动力学光谱

Figure 4 Light-induced transient absorption changes of the M, O states and recovery towards the ground state at 410nm ,660nm and 570nm, respectively for the recombinant bR and aR4

(a) RC^{L33}-aR4; (b) F146M^{L33}-aR4; (c) RC^{L33}-bR; (d) M145F^{L33}-bR

可以看出，F146M^{L33}-aR4 突变体与 RC^{L33}-aR4 相比，M 态与 O 态变化不大，整体恢复到基态时间略有缩短。M145F^{L33}-bR 与 RC^{L33}-bR 相比，M 态与 O 态信号均有所减弱，同时 M 态衰减时间略有缩短。相关时间拟合数据如表 2 所示。

晶体结构显示，bR 从 K 态过渡到 L 态时，W182 发生了明显转向 M145 的移动[14]。M145F^{L33}-bR 突变后造成局部空间位阻变大，干扰了 W182 与视黄醛甲基之间的相互作用，使得 K 态向 M 态的转变受阻，从而造成了 M 态，O 态的信号减弱，如图 5 所示。相反，F146M^{L33}-aR4 突变并未对其 M，O 态造成显著的影响，究其原因可能是 aR4 的视黄醛键合区空腔大于 bR 的，F146M^{L33}-aR4 突变对其周围残基的排列和动态构象影响不大，这与 aR4 是一个弱质子泵是一致的(Wang, Ma et al. 2012)。

表 2 由多指数函数拟合图 4 数据轨迹所得时间常数及百分比

Table 2. Time constants and amplitudes resulting from multi-exponential fitting to the data traces depicted in the Figure 4

Protein	M-decay (ms)	O-rise (ms)	O-decay (ms)	Recovery to G state (ms)		
				1st	2nd	3rd
RC^{L33}-aR4	2.41 100%	0.35 100%	3.39 100%	0.49 79.2%	2.85 17.0%	36.60 3.8%
F146M^{L33}-aR4	2.73 100%	0.27 100%	2.88 100%	142.8 16.0%	8.10 19.3%	1.19 64.6%
RC^{L33}-bR	5.14 100%	1.32 100%	3.22 100%	3.63 39.4%	22.14 0.6%	0.43 59.9%
M145F^{L33}-bR	4.64 100%	1.76 100%	2.37 100%	3.29 58.9%	6.95 30.8%	0.31 10.4%

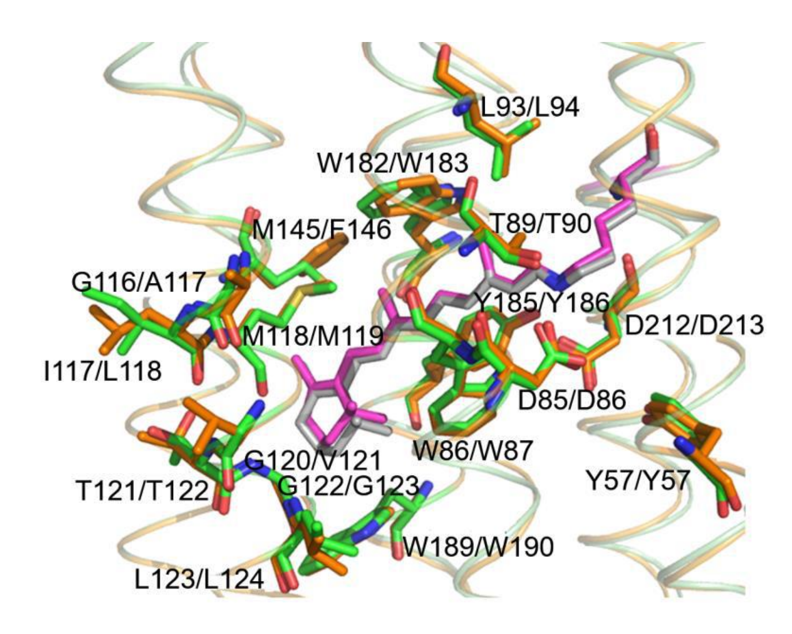


图 5 bR 和 aR4 的视黄醛结合口袋示意图

Figure 5 Retinal binding pocket of bR (green) and aR4(orange)..

2.5 质子泵功能检测

RC^{L33}-aR4 和 RC^{L33}-bR 的质子泵功能检测结果如图 6 所示。表 3 是根据图 6 的数据轨迹采用指数函数拟合得到的质子泵恢复时间。结合图 6 和表 3 可以看出，RC^{L33}-aR4 和 RC^{L33}-bR 的质子传递顺序相反，RC^{L33}-bR 是先释放后吸收，而 RC^{L33}-aR4 是先吸收后释放，且信号强度明显较弱，质子吸收释放的整体时间也较短，这与二者质子传递能力的差异是一致的。F146M^{L33}-aR4 和 M145F^{L33}-bR 与其对应的重组野生型蛋白比较质子传递顺序均没有发生改变，但在质子泵恢复时间上有一定变化。F146M^{L33}-aR4 的质子泵恢复时间 2.09 ms，与 RC^{L33}-aR4 相比略有延长，信号强度没有发生太大变化。M145F^{L33}-bR 的质子泵恢复时间 2.17 ms，与 RC^{L33}-bR 相比明显缩短，并且信号强度明显减弱，M145F 突变后对质子传递速率和质子吸收释放的难易程度影响较大，而 F146M 突变的影响较小，表明 M145 在 bR 质子传递中所起的作用要大于 F146 在 aR4 中的作用。

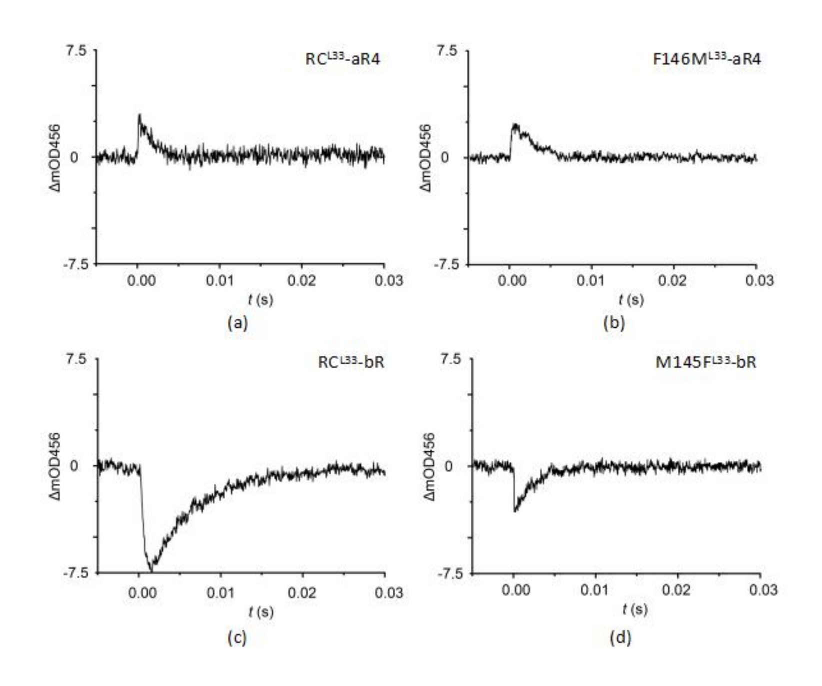


图 6 重组 bR 和 aR4 的质子泵功能检测

Figure 6 Proton pumping curves of recombinant bR and aR4

(a) RC^{L33}-aR4; (b) F146M^{L33}-aR4; (c) RC^{L33}-bR; (d) M145F^{L33}-bR

表 3 由指数函数拟合图 6 数据轨迹所得时间常数

Table 3. Time constants resulting from exponential fitting to the data traces depicted in the Figure 6

Protein	RC^{L33}-aR4	F146M^{L33}-aR4	RC^{L33}-bR	M145F^{L33}-bR
Recovery time (ms)	1.38	2.09	5.93	2.17

2. 5 低温透射红外光谱

进而采用低温透射红外光谱技术对重组蛋白的光循环中间态进行了对比研究，如图 7-8 所示。1255，1216，1202 及 1169cm^{-1} 的峰位可归属为全反式视黄醛发色团的 C–C 的伸缩振动[15]，而 1194cm^{-1} 位置的峰则可归属为 13-顺视黄醛混合伸缩振动[16]，在 M，N 态时由于席夫碱的去质子化使得该峰位移到了 1186cm^{-1} 处。K 态时 1514（+）/1529（-）这一对峰归属为视黄醛多烯链的 C=C 伸缩振动[17]。1741（-）/1735（+）归属为 D115 羧基的伸缩振动，与 D96 之间互相影响[18]。M 态时，席夫碱去质子化将质子传递给 D85，出现 1760cm^{-1} 位置 D85 质子化的正峰[18]，该质子化状态一直保持到了 N 态。另外，N 态 1742cm^{-1} 处负峰增强，表明质子从 D96 转移到席夫碱，席夫碱重新质子化过程[6]。可以看出，M145F^{L33}-bR

与 RC^{L33}-bR 相比发生较大变化。L 态位于 1762cm^{-1} 处的振动峰出现，标志着 D85 的质子化，即 M 态的产生，表明 M145F 突变造成了 bR 光循环由 K→M 态的直接过渡。已有文献报道，bR 中的 W182 与视黄醛侧链 C13 相连的甲基存在相互作用，从 K 态到 L 态转变过程中，W182 向 M145 移动，L93 侧链发生旋转，从而导致 13-顺式视黄醛的扭曲程度减弱[14]，而 M145F 突变则可能造成了 W182 向 M145 移动受阻，L93 侧链无法发生旋转。同为质子泵的 aR2 和 cR3（cruxrhodopsin3, cR3）晶体结构揭示，处于与 M145 相同位置的 F150 或 L149 均造成了视黄醛 C13 甲基的运动受限，K 到 L 的转换受阻，aR2 导致了 L 态缺失[19]，而 cR3 导致 L 衰减加快，动力学检测不到[20]。因而，可以推测 M145F 突变增大了局部的空间位阻，使得 L 态的生成受到影响以及衰减时间变快，从而导致了 K→L→M 态的转变变为了 K→M 态的直接过渡，而这一现象与在 RC^{L33}-aR4 中观察到的一致。

RC^{L33}-aR4 中间态的红外光谱与 RC^{L33}-bR 相比，视黄醛 C=C 的伸缩振动峰强度明显减弱，差谱显示视黄醛两种状态的 C=C 振动差异较小。此外，RC^{L33}-aR4 与 $M145F^{L33}$-bR 一致，在 L 态已观察到 D86 的质子化（1765cm^{-1} 处的正峰出现）。

$F146M^{L33}$-aR4 与 RC^{L33}-aR4 相比，天冬氨酸残基的质子化状态基本没有变化。D86 和 D97 在 L 态均处于质子化状态（1766cm^{-1}（+），1742cm^{-1}（-）），表明 $F146M^{L33}$-aR4 突变体对中间态质子化过程以及中间态转换没有产生太大影响。$F146M^{L33}$-aR4 突变体的视黄醛烯烃链的 C=C 伸缩振动峰型与 RC^{L33}-bR 相近，强度也相似，而 RC^{L33}-aR4 和 $M145F^{L33}$-bR 的中间态差谱中 C=C 伸缩振动产生的峰强度相对较弱。这可能是因为甲硫氨酸突变成苯丙氨酸后空间位阻变大，而苯丙氨酸突变成甲硫氨酸后空间位阻变小，所以 RC^{L33}-aR4 和 $M145F^{L33}$-bR 由于空间位阻相似，对视黄醛的 C=C 伸缩振动影响不大，差谱未见显著变化。而 $F146M^{L33}$-aR4 和 RC^{L33}-bR 则刚好相反，空间位阻对 C=C 伸缩振动产生了明显的影响。$F146M^{L33}$-aR4 突变体对中间态的转变没有造成显著的影响，与 RC^{L33}-aR4 一致，但是对视黄醛 C=C 的伸缩振动有一定的影响，表明虽然 F146 突变造成空间位阻变小，空间结构变得较为柔性，C=C 的振动更为灵活，但是没有阻碍与突变位点相关残基以及视黄醛的原本的整体运动轨迹。

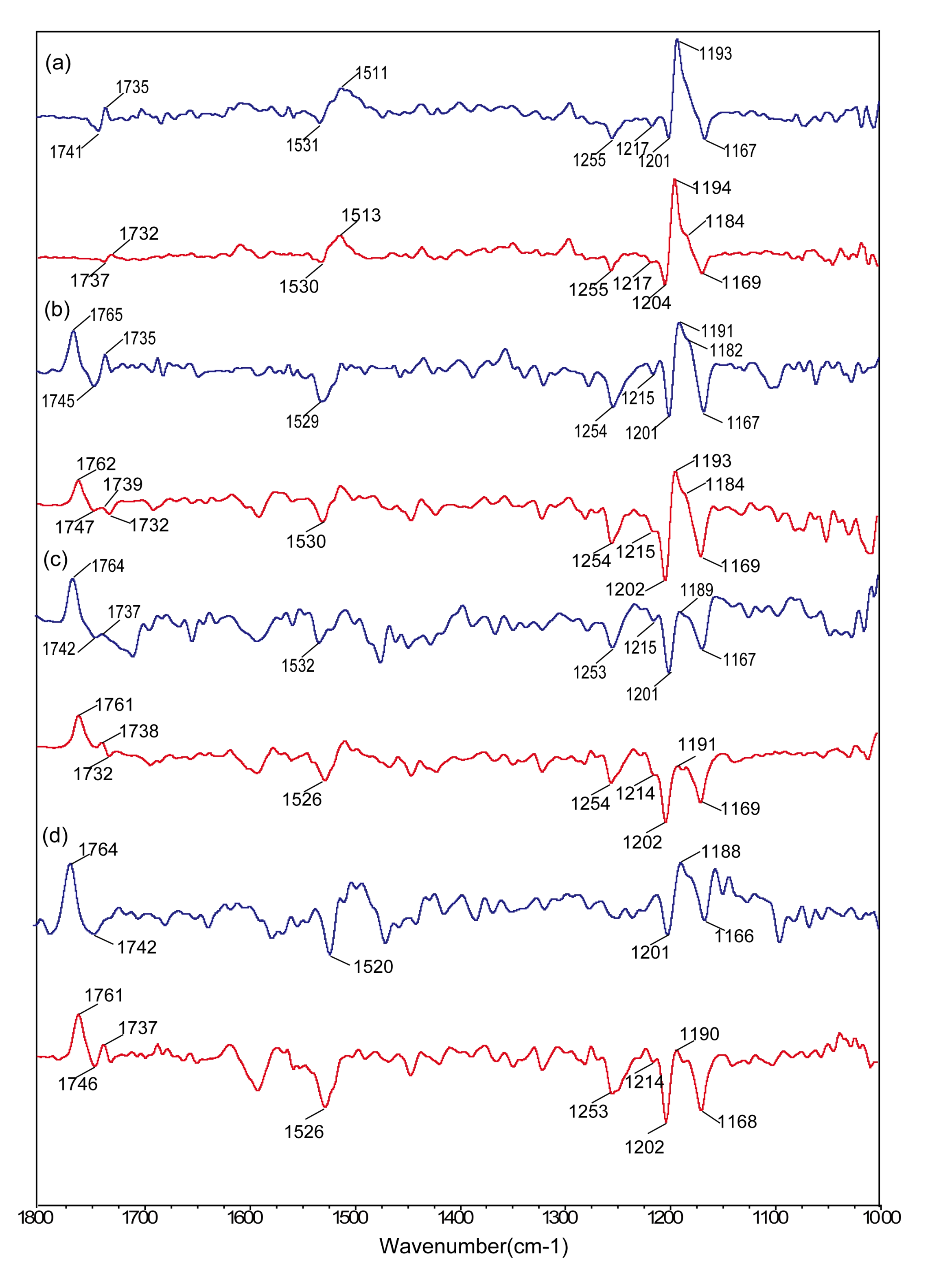


图 7 RC^{L33}-aR4 和 M145F^{L33}-bR 蛋白的中间态低温透射红外光谱

Figure 7 Low temperature transmission infrared spectra of photo-intermediate states of RC^{L33}-aR4 and M145F^{L33}-bR. The spectra record the intermediate states of RC^{L33}-aR4(blue) and M145F^{L33}-bR(red).(a) The spectra of K state.(b) The spectra of L state.(c) The spectra of M state.(d) The spectra of N state.

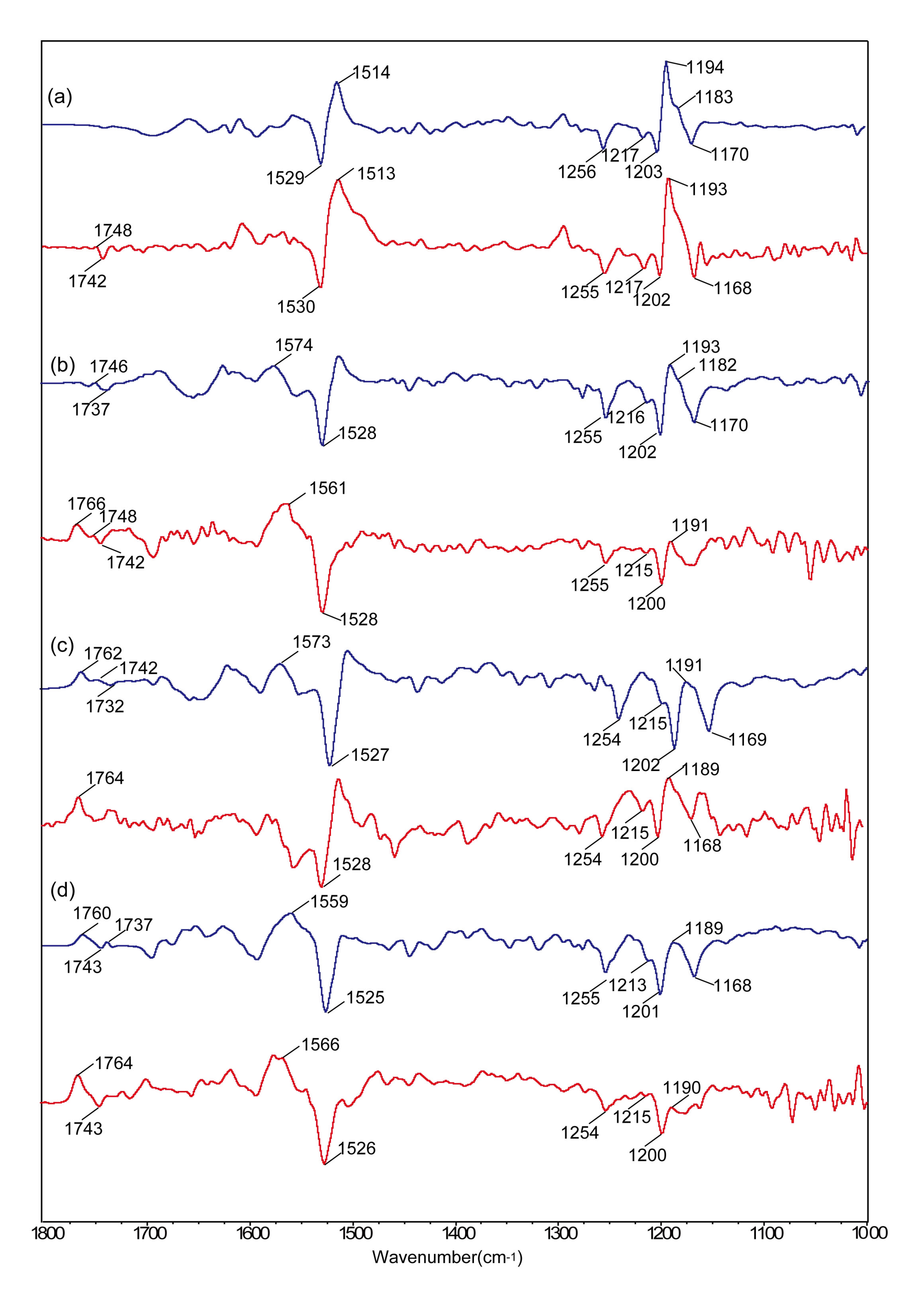


图 8 RC^{L33}-bR 和 F146M^{L33}-aR4 蛋白的中间态低温透射红外光谱

Figure 8 Low temperature transmission infrared spectra of photo-intermediate states of RC^{L33}-bR and F146M^{L33}-aR4. The spectra record the intermediate states of RC^{L33}-bR(blue) and F146M^{L33}-aR4(red).(a) The spectra of K state.(b) The spectra of L state.(c) The spectra of M state.(d) The spectra of N state.

3 结论

本文采用多种光谱技术对比研究了 M145F^{L33}-bR 和 F146M^{L33}-aR4 对二个质子泵蛋白光循环的影响。紫外光谱和动力学光谱研究表明，两个突变对视黄醛的紫外吸收影响结果恰好相反，前者发生蓝移，后者发生红移，表明视黄醛侧链的扭曲程度是和突变残基侧链大小是一致的。相对于野生型 bR 而言，M145F^{L33}-bR 突变导致 M 态和 O 态在一定程度上变弱，且质子泵功能减弱。但 F146M^{L33}-aR4 突变则没有造成类似的改变。

光循环中间态红外差谱结果进一步表明，M145F^{L33}-bR 和 F146M^{L33}-aR4 都受到空间位阻变化的影响，两个突变体的视黄醛烯烃链的 C=C 伸缩振动与野生型相比都发生变化，M145F^{L33}-bR 的视黄醛 C=C 伸缩振动的峰变弱更趋向于 RC^{L33}-aR4，而 F146M^{L33}-aR4 的视黄醛烯烃链 C=C 伸缩振动变强，说明前者差谱前后两个状态的视黄醛烯烃链 C=C 振动差异更小，而后者空间结构更为疏松，C=C 振动差异更大，振动更为灵活。Met145 突变造成了 bR 光循环由 K→M 态的直接过渡，而 F14M 突变并未造成 aR4 质子传输时序的反转，M145F 和 F146M 突变对两个蛋白光循环造成的影响不尽相同。

[1] Wang, Y Z, Ma, D W, Zhao, Y C, et al. Light-driven proton pumps of archaerhodopsin and bacteriorhodopsin and polymer-matrix composite materials of those functional proteins. Acta Polymerica Sinica, 2012, 012(7): 698-713.

[2] Wang, J, and El-Sayed, M A Time-resolved Fourier transform infrared spectroscopy of the polarizable proton continua and the proton pump mechanism of bacteriorhodopsin. Biophysical Journal, 2001, 80(2): 961-971.

[3] Ernst, O P, Lodowski, D T, Elstner, M, et al. Microbial and Animal Rhodopsins: Structures, Functions, and Molecular Mechanisms. Chemical Reviews, 2014, 114(1): 126-163.

[4] Mukohata, Y, Sugiyama, Y, Ihara, K, et al. An Australian halobacterium contains a novel proton pump retinal protein: Archaerhodopsin. Biochemical and Biophysical Research Communications, 1988, 151(3): 1339-1345.

[5] 唐琳，孙庆安，李庆国, et al. 西藏嗜盐菌 xz515 紫红膜中类菌紫质分子的 AFM 成像. 科学通报, 2001, 46(14): 1176-1179.

[6] Braiman, M S, Mogi, T, Marti, T, et al. Vibrational spectroscopy of bacteriorhodopsin mutants: light-driven proton transport involves protonation changes of aspartic acid residues 85, 96, and 212. Biochemistry, 1988, 27(23): 8516-8520.

[7] Bousche, O, Braiman, M, W He, Y, et al. (1991) *Vibrational spectroscopy of bacteriorhodopsin mutants. Evidence that ASP-96 deprotonates during the M----N transition*, Vol. 266.

[8] Sonar, S, Marti, T, Rath, P, et al. A redirected proton pathway in the bacteriorhodopsin mutant Tyr-57-->Asp. Evidence for proton translocation without Schiff base deprotonation. Journal of Biological Chemistry, 1994, 269: 28851-28858.

[9] Ihara, K, Amemiya, T, Miyashita, Y, et al. Met-145 is a key residue in the dark adaptation of bacteriorhodopsin homologs. Biophysical Journal, 1994, 67(3): 1187-1191.

[10] Kouyama, T, Fujii, R, Kanada, S, et al. Structure of archaerhodopsin-2 at 1.8 Å resolution. Acta Crystallogr D Biol Crystallogr, 2014, 70(10): 2692-2701.

[11] 王娟，郜玉娇，孙超, et al. D97N 突变对光受体蛋白古紫质 4 质子泵和能量转换效率的影响．中国生物工程杂志, 2017, 37(9): 23-30.

[12] Cline, S W, Lam, W L, Charlebois, R L, et al. Transformation methods for halophilic archaebacteria. Canadian Journal of Microbiology, 1989, 35(1): 148-152.

[13] Oesterhelt, D, and Stoeckenius, W Rhodopsin-like Protein from the Purple Membrane of Halobacterium halobium. Nature New Biology, 1971, 233: 149.

[14] !!! INVALID CITATION !!!

[15] Rothschild, K J, Marrero, H, Braiman, M, et al. Primary photochemistry of bacteriorhodopsin: comparison of fourier transform infrared difference spectra with resonance raman spectra. Photochemistry and Photobiology, 1984, 40(5): 675-679.

[16] Smith, S O, Myers, A B, Mathies, R A, et al. Vibrational analysis of the all-trans retinal protonated Schiff base. Biophysical Journal, 1985, 47(5): 653-664.

[17] Rothschild, K J, and Marrero, H Infrared evidence that the Schiff base of bacteriorhodopsin is protonated: bR570 and K intermediates. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1982, 79(13): 4045-4049.

[18] Braiman, M S, Mogi, T, Stern, L J, et al. Vibrational spectroscopy of bacteriorhodopsin mutants: I. Tyrosine-185 protonates and deprotonates during the photocycle. Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics, 1988, 3(4): 219-229.

[19] Kouyama, T, Fujii, R, Kanada, S, et al. Structure of archaerhodopsin-2 at 1.8 Å resolution. Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography, 2014, 70(Pt 10): 2692-2701.

[20] Chan, S K, Kitajima-Ihara, T, Fujii, R, et al. Crystal Structure of Cruxrhodopsin-3 from Haloarcula vallismortis. PLoS ONE, 2014, 9(9): e108362.

Effect of Mutation of M145F / F146M on the Photocycle of Photoreceptors Bacteriorhodopsin and Archaerhodopsin 4

Abstract Both archaerhodopsin 4 (aR4) and bacteriorhodopsin (bR) belong to the *Halobacterium* family, share 59% homology and function as proton pumps to transfer protons from the cytoplasmic side to the extracellular side to convert light energy to chemical energy through ATP synthesis. Although aR4 has a similar photocycle as bR, it has an opposite temporal order of proton uptake and release at neutral pH. Methionine-145 (M145), one of the key residues locating within the retinal binding pocket in bR, has significant influence on the bR photocycle. Phenylalanine-146 (F146) is the corresponding residue within the retinal binding pocket in aR4, and is the only different binding residue between the two proteins. In this study, effects of M145F and F146M mutations on the photocycle of bR and aR4 were studied by UV-VIS spectroscopy, light-induced kinetic change spectroscopy, proton pumping analysis and low temperature transmission FTIR spectroscopy. Loss of L state and decrease of the proton pumping capability in M145F mutation were observed in the bR photocycle, whereas neither a significant affect to the photocycle nor any a change to proton release and uptake order by F146M mutation were observed in aR4, which clear indicated that the function roles of the two residues are not exactly the same in the two proton pumps.

Key words Archaerhodopsin 4 M145F/F146M single point mutation Intermediate state and photocycle Proton pump Low temperature transmission FTIR spectroscopy